

DIE WIRKUNG VON ACTINOMYCIN D
AUF CHINESISCHE HAMSTERZELLEN
IN VITRO

Sok Hia Lie-Ruf

Diss. München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0071

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der
Universität München
Direktor: N.N.

Die Wirkung von Actinomycin D auf
Chinesische Hamsterzellen in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Sok Hia Lie - Ruf
aus
Jakarta - Indonesien
München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K.R. Trott

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Riethmüller

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 1984

Für die freundliche Überlassung des Themas, für die Betreuung bei der Durchführung der Versuche und für die wertvollen Anregungen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.R. Trott bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Eichholtz-Wirth, die mir während der Versuche jederzeit mit ihrer Hilfe und wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.

An dieser Stelle möchte ich auch den Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Institutes, Frau Pfeifer und Frau Hacker, meinen Dank aussprechen, die mich während meiner praktischen Arbeit freundlich unterstützten.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	2
2.1. Zytostatikum	2
2.1.1. Chemische Struktur	2
2.1.2. Wirkungsweise	3
2.1.3. Klinische Anwendung und Erfahrungen mit Actinomycin D	4
2.1.4. Actinomycin D und Strahlentherapie	5
2.1.5. Nebenwirkungen von Actinomycin D	5
2.1.6. Das Präparat Actinomycin D	5
2.2. Zellkultivierung	6
2.2.1. Zelltyp	6
2.2.2. Das Medium	6
2.2.3. Arbeitsplatz und Arbeitsmaterial	6
2.2.4. Passage	7
2.2.5. Koloniesausbeute	9
2.3. Durchführung der Versuche	9
2.3.1. Versuche über die Abhängigkeit von der Konzentration	10
2.3.2. Versuche über die Abhängigkeit von der Act D Expositionszeit	10
2.3.3. Versuche mit fraktionierter Actinomycin D Expositionszeit	11
2.4. Untersuchung über den Einfluß von Mannit auf die Zellkulturen	12
2.5. Prüfung des Aktivitätsverlustes von Act D während der Inkubationsdauer	14
3. Ergebnisse	17
3.1. Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Act D Konzentration	17
3.2. Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Expositionszeit mit Act D	20
3.3. Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Fraktionierung der Act D Gabe	22

	Seite
4. Diskussion	35
4.1. Dosisseffekt	35
4.2. Zeiteffekt	38
4.3. Fraktionierung	40
5. Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	43

1. Einleitung

Actinomycin wurde erstmals 1940 von Waksman und Woodruff aus einer Actinomyceskultur isoliert. In der Folge wurden dann mehrere Arten von Actinomycin gefunden, die sich in der Zusammensetzung der an das Chromophor gebundenen Peptidseitenketten unterscheiden. Darunter befand sich auch Actinomycin D, das 1954 von Manaker et al. (21) isoliert und beschrieben wurde.

Über die cytostatische Wirksamkeit dieses Stoffes bei lymphatischen und myeloischen Leukämien von Mäusen berichtete erstmals Farber (17). Erste klinische Studien mit Actinomycin D, die von Farber et al. (18) an Kindern mit Rhabdomyosarkom, Wilms-tumor und Morbus Hodgkin durchgeführt wurden, zeigten vorübergehend eine deutliche Besserung.

Seitdem gehört Actinomycin D bei verschiedenen bösartigen Erkrankungen zu den allgemeinen anerkannten zytostatischen Medikamenten.

Um weitere Aufschlüsse über dieses Medikament zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit in Analogie zu ionisierenden Strahlen die Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Konzentration, Einwirkdauer und Fraktionierung in vitro an Chinesischen Hamsterzellen untersucht.

2. Material und Methode

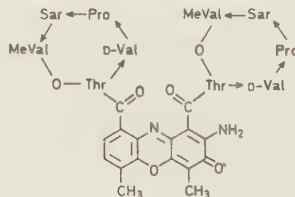
2.1 Zytostatikum

Actinomycin D ist ein Antibiotikum und der Hauptbestandteil des Actinomycingemisches, das *Streptomyces parvulus* bildet.

Wegen seiner extrem hohen Toxizität, im Vergleich zu seiner antibakteriellen Wirkung, wird Actinomycin D nur noch in der Tumorthherapie verwendet. Darüberhinaus ist Actinomycin D wegen seiner hohen spezifischen Hemmung der RNA Polymerase bzw. RNA Synthese zu einer wichtigen Substanz in der Biochemie geworden (25).

2.1.1 Chemische Struktur

Actinomycin D ist ein Peptid-Antibiotikum (s. Abb. 1). Es enthält einen Phenoxazinring (eine Farbstoffgruppe) mit zwei Carbonylgruppen, die säureamidartig an der terminalen Aminogruppen je eines Pentapeptids gebunden sind. Die beiden Pentapeptide sind identisch und bestehen jeweils aus L-Threonin, D-Valin, L-Prolin, Sarkosin (N-Methylglycin) und L-Methylvalin. Durch eine Esterbindung zwischen der Carbonylgruppe des Methyl-Valins und der Hydroxygruppe des Threonins wird ein



Actinomycin D

Abb. 1: Strukturformel

makrozyklischer Lactonring gebildet. Abgesehen von deutlichen strukturellen Unterschieden an den beiden Seiten des Phenoxazonringes hat Actinomycin D eine annähernd doppeltsymmetrische Struktur (s. auch Abb. 2).

2.1.2 Wirkungsweise

Biochemische Versuche haben gezeigt, daß Actinomycin D sehr dicht an den Guanin enthaltenden Regionen eines DNA Doppelstranges gebunden wird (Abb. 2). Ein Desoxyguanin-Actinomycin Komplex wird gebildet. Der Phenoxazinring liegt im Zentrum des Komplexes, wobei sich die eine Peptidschleife oberhalb und die andere unterhalb des Ringes befindet. So ist eine doppelte Symetrie sowohl in dem Desoxyguanosin Komplex als auch in Actinomycin D selbst vorhanden.

ACTINOMYCIN D, A TOXIC ANTIBIOTIC

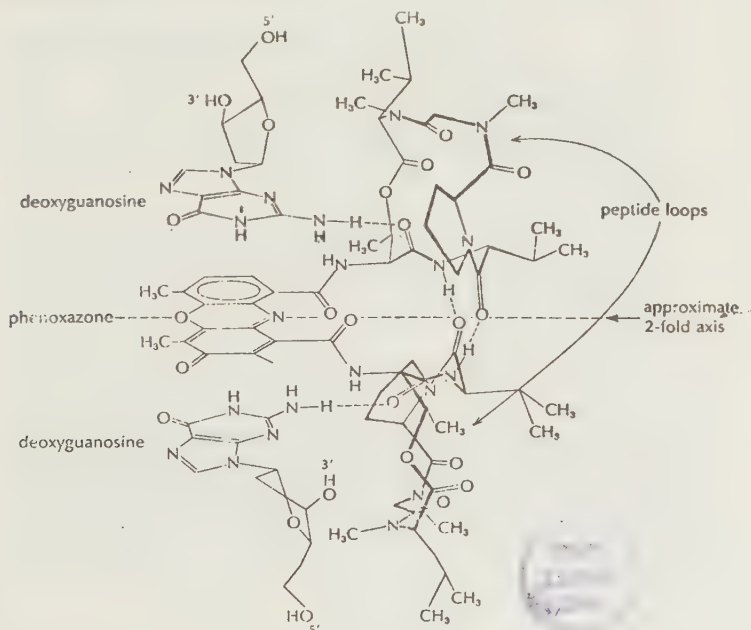


Abb. 2: Actinomycin -Desoxyguanosinkomplex
(aus Metzler D.E. Biochemystrey 1977)

Der Phenoxazinring liegt zwischen den beiden flachen Desoxyguanosinringen und wird durch van der Waall'sche Kräfte gehalten. Mit den Carbonylgruppen der Threonine bilden die zwei Aminogruppen der Desoxyguanosinen eine starke Wasserstoffbrücke. Da die anderen H-Atome von den gleichen Aminogruppen, die N-1 Hydrogen Atome und die Carbonylgruppen der Guaninringe für eine Wasserstoffbrücke eines CG Basen Paares verfügbar sind, kann der Phenoxazinring des Actinomycins zwischen beiden CG Basen Paaren eines DNA Doppelstranges intercalieren (25, 31). Damit blockiert Actinomycin D die Ablesung, die nach dem Prinzip der Basenpaarung erfolgt. Dabei ist die DNA abhängige RNA Polymerase offensichtlich viel empfindlicher gegen solche Störungen als die DNA Polymerase. Bei einer geringeren Konzentration von Actinomycin D wird deshalb die Transkription einer RNA Synthese eher gehemmt als die DNA Replikation (20). Demzufolge wird auch die Proteinsynthese erheblich gestört.

2.1.3 Klinische Anwendung und Erfahrungen mit Actinomycin D

Klinisch findet Actinomycin D Anwendung in der Immunsuppression und in der Behandlung von bestimmten soliden Tumoren, wobei die Anwendung des Medikamentes auf seiner zytotoxischen Eigenschaft beruht. In erster Linie bewährt sich Actinomycin D in der Therapie des Wilmstumors, testiculärer Tumoren und des Chorionkarzinoms.

Von den genannten Neoplasmen spricht der Wilmstumor, ein embryonales Adenosarkom der Niere, mit großer Neigung zur Metastasierung in die Lungen und die regionalen Lymphknoten, am besten auf Actinomycin D an.

Weniger eindrucksvoll ist der therapeutische Effekt von Actinomycin D beim Rhabdomyosarkom (18). Actinomycin D wird ferner bei der Behandlung der Neoplasmen des Hodens oder des Uterus zusammen mit alkylierenden Zytostatika und/oder mit Antimetaboliten gegeben.

2.1.4 Actinomycin D und Strahlentherapie

Oft erzielt man einen besseren Effekt in der Tumorbildung, wenn man Actinomycin mit Strahlen kombiniert. Zahlreiche Befunde beweisen, daß sich Actinomycin D und Strahlen wechselseitig beeinflussen. Es ist möglich, daß sich der klinisch beobachtete Synergismus zwischen beiden auf eine Interferenz des Actinomycin D mit der Reparatur der durch Strahlen geschädigten DNA beruht (4, 8).

2.1.5 Nebenwirkungen von Actinomycin D

Wie alle Zytostatika besitzt Actinomycin D eine Reihe von Nebenwirkungen. Übelkeit und Erbrechen treten ziemlich früh nach Verabreichung auf. Störungen im hämatopoetischen System in Form von Anämie, Agranulozytose, Leukopenie, Thrombopenie sind oft gravierend. Beschwerden im Magen-Darm-Trakt sowie Hautveränderungen und Alopezie sind möglich. Bei sehr starker Ausprägung dieser Nebenwirkungen kann es auch zu Todesfällen kommen.

2.1.6 Das Präparat Actinomycin D

In den vorliegenden Versuchen wurde Actinomycin D mit dem Handelsnamen Lyovac-Cosmegen von der Firma Sharp & Dohme in Ampullen zu je 0,5 mg Trockensubstanz in Form von lyophilisiertem Pulver verwendet.

Aus Gründen der Isotonie enthielt jede Ampulle noch zusätzlich 20 mg Mannit. Der Inhalt jeder Ampulle wurde zunächst in einem Milliliter sterilem aqua bidestillata gelöst.

Um die entsprechenden weiteren Konzentrationen zu erhalten, wurde Hanks Salzlösung (Tab. 1) als Lösungsmittel für die gewünschte Verdünnung benutzt.

2.2 Zellkultivierung

2.2.1 Zelltyp

In den Versuchen wurden Chinesische Hamsterzellen B-14-FAF 28, eine von Lungenfibroblasten stammende Linie (5) benutzt, deren Chromosomensatz aus 22 Chromosomen bestand. Die mittlere Generationszeit der Zellen beträgt 11 - 14 h. Zweimal pro Woche wurden sie passagiert.

2.2.2 Das Medium

Das Nährmedium bestand aus Eagle's Minimum Essential-medium + Hank's Salzlösung (Tab. 1) mit 10% Kalbserum

2.2.3. Arbeitsplatz und Arbeitsmaterial

Die Zellen wurden in Vierkantflaschen aus Glas (Schott) gezüchtet, welche durch Aluminiumfolie verschlossen wurden. Alle bei den Versuchen benötigten Arbeitsgeräte, Behälter und Lösungen waren sterilisiert.

Der Arbeitsplatz befand sich in einer Reinluftbank (laminar flow bank) und wurde in den Arbeitspausen durch UV Lichtbestrahlung sterilisiert.

Konsequentes Abflammen der Öffnungen der Behälter und Schräghalten der Gefäße während des Arbeitsprozesses reduzierte erheblich die Gefahr einer Kontamination der Kulturen mit Pilzen und Bakterien. Trotzdem war dies jedoch nicht immer zu verhindern.

2.2.4 Passage

Bei der Passage wurde das Medium der alten Zellkultur abgegossen und verworfen. Anschließend wurden 2 ml 0,25%-tge Trypsinlösung in die Flasche gegeben. Diese Trypsinbehandlung des Zellrasens dauerte 7 Minuten bei 37°C. Die Zellen lösten sich dadurch vom Flaschenboden ab, zugleich lösten sich die interzellulären Bindungen und die Zellen schwammen frei in der Trypsinlösung.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde mit Nährlösung 1 : 10 verdünnt.

Mittels einer Zählkammer (Bürker) wurde die Zellzahl pro ml in dieser verdünnten Zellsuspension unter dem Mikroskop ermittelt. An Hand des Zählergebnisses wurden beliebige Zellkonzentrationen mit Hilfe von Verdünnungsreihen hergestellt. Für die einfache Passage zur Weiterführung der Zellkultur wurden 70.000 bis 100.000 Zellen zusammen mit 10 ml Nährmedium in eine Versuchsflasche eingefüllt. Die mit Aluminiumfolie verschlossenen Flaschen wurden dann bei 37°C im Brutschrank in einer feuchten und mit 3% CO₂ angereicherten Atmosphäre inkubiert.

Tabelle 1: Zusammensetzung und Herstellung des
verwendeten Nährmediums

Die Nährlösung bestand aus Eagle's Minimum Essential
Medium + Hank's Salze in Pulverform.

Eine Ampulle zu 10,7 g enthielt:

Zusammensetzung	mg/l	Zusammensetzung	mg/l
<u>Eagle's Minimum Essential</u>			
<u>Medium:</u>			
L-Arginin	105	L-Tryptophan	10
L-Cystin	24	L-Tyrosin	36
L-Glutamin	292	L-Valin	46
L-Histidin	31	Cholinchlorid	1
L-Isoleucin	52,5	Folsäure	1
L-Leucin	52,4	i-Inosit	2
L-Lysin	58	Nicotinamid	1
Thiamin HCl	1	D-Pantothensäure-	1
KCl	400	Ca-Salze	
L-Methionin	15	Pyridoxal HCl	1
L-Phenylalanin	32	Riboflavin	0,1
L-Threonin	48		
<u>Hank's Salze:</u>			
NaCl	8000	CaCl ₂ wasserfrei	140
Na ₂ HPO ₄ : 2 H ₂ O	60	Glucose	1000
KH ₂ PO ₄	60	Phenolrot	10
MgSO ₄ : 7 H ₂ O	200		

Der Inhalt einer Ampulle wurde mit 350 mg NaHCO₃, 2 ml
1n NaOH und 100 mg Neomycinsulfat in einem Liter aqua
dest. gelöst und mittels einer Passage durch einen
Bakterienfilter sterilisiert.

2.2.5 Kolonieausbeute

Neben der Weiterführung der Zellstammkultur wurden auch Kulturflaschen mit 200 Zellen angelegt. Diese wurden nach einer Woche aus dem Brutschrank genommen. Zu dieser Zeit waren schon Zellkolonien mit bloßem Auge sichtbar.

Nachdem das alte Medium abgegossen wurde, wurde dann in die Flaschen Methylenblau zum Färben gegeben.

Im nächsten Schritt wurden unter dem Stereomikroskop die blau gefärbten Zellkolonien ausgezählt. Als Kolonie wurden nur diejenigen Zellkolonien bewertet, die mindestens 50 Einzelzellen aufweisen.

Das Verhältnis zwischen dem Zählergebnis und der eingesäten Zellzahl, in Prozent ausgedrückt, wurde als Kolonieausbeute (PE Wert = plating efficiency) gewertet.

2.3 Durchführung der Versuche

Die Überlebensrate der chinesischen Hamsterzellen unter der Wirkung von Actinomycin D wurde in diesen Versuchen in dreierlei Hinsicht untersucht:

1. auf die Abhängigkeit von der Act D Konzentration
2. auf die Abhängigkeit von der Dauer der Act D Exposition
3. auf die Abhängigkeit von der Fraktionierung

Die bei den Versuchen verwendeten Zellen wurden wie bei einer normalen Passage gewonnen. In die Versuchsflaschen wurden je nach Bedarf 200 bis 2000 Zellen eingesät.

2.3.1 Versuche über die Abhängigkeit von der Konzentration

Für eine konstante Expositionszeit wurden verschiedene Konzentrationen (0,01, 0,05, 0,10 und 0,20 $\mu\text{g/ml}$) von Act D in die Kulturflaschen gegeben, die bereits die Zellen und 10 ml Medium enthielten. Parallel dazu wurden jedesmal als Kontrolle 4 Flaschen mit jeweils 200 eingesäten Zellen ohne Zusatz von Act D vorbereitet. Diese wurden dann für die weiteren Vorgänge genauso behandelt wie die anderen Versuchsflaschen. Ihre PE wurde als 100% festgelegt und diente als Vergleich für die jeweils dazugehörigen Versuchsergebnisse, da ihre Überlebensrate lediglich durch die Zellverluste bei der mechanischen Behandlung beeinflusst wurde. Alle Flaschen samt Kontrollflaschen wurden dann im Brutschrank für die Dauer der Act D Exposition inkubiert. Am Ende der Einwirkdauer wurde das Actinomycin D haltige Medium abgesaugt und es folgte eine zweimalige Spülung mit Hank's Salzlösung, um eventuell verbliebene Spuren von Act D zu entfernen.

Zum Schluß, nachdem in die Flaschen 10 ml frisches Medium hinzugegeben war, kamen sie erneut in den Brutschrank. Nun wurden die Zellsuspensionen eine Woche lang bebrütet, um ihnen die Möglichkeit zur Kolonienbildung zu geben. Nach Ablauf dieser Zeit wurden sie wie oben schon erwähnt, mit Methylblau gefärbt und gezählt.

2.3.2 Versuche über die Abhängigkeit von der Act D Expositionszeit

Hier wurden die Zellen bei gegebener Konzentration verschieden lang mit Act D behandelt. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde die Act D enthaltende

Lösung aus den Flaschen entfernt und diese wurden zweimal mit Hank's Lösung gespült. Die weiteren Arbeitsschritte waren die selben wie bei 2.3.1.

2.3.3 Versuche mit fraktionierter Actinomycin D Expositionszeit

In den beiden hier durchgeführten Versuchen wurde jedesmal die gesamte Actinomycin D Expositionszeit in zwei Teile zerlegt. Das bedeutete, daß ein zytostatikumfreies Intervall von mehreren Stunden zwischen den beiden Zeithälften eingeschoben wurde.

In der ersten Zeithälfte wurden die Zellen wie üblich mit der gewünschten Actinomycin D Konzentration behandelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde Actinomycin D aus den Flaschen entfernt und die Flaschen wurden mit Hank's Lösung zweimal gespült, um Actinomycin D Reste zu entfernen. Anschließend wurden sie mit 10 ml frischem, vorgewärmtem Medium wieder aufgefüllt und für den entsprechenden Zeitraum in den Inkubator zurückgebracht. Am Ende des freien Intervalls wurden sie nach Entnahme aus dem Inkubator für die zweite Zeithälfte mit der gleichen Act D Konzentration wie zuvor behandelt. Die folgenden Arbeitsschritte waren dann wie in 2.3.1 beschrieben.

2.4 Untersuchung über den Einfluß von Mannit auf die Zellkulturen

Wie schon oben beschrieben enthielt die in diesem Versuch verwendete Actinomycin D Ampulle Mannit. Zur Untersuchung, ob dieses auf die Zellkulturen einen Einfluß habe, wurden zwei Versuche mit Mannit aber ohne Actinomycin D gemacht.

Beim ersten wurden 20 $\mu\text{g/ml}$ und beim zweiten 50 $\mu\text{g/ml}$ Mannit zu 200 Zellen ins Medium gegeben.

Parallel liefen Kontrollversuche ohne Mannit. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit wurde das Mannit wieder aus den Flaschen entnommen und die Zellkulturen wurden wie üblich weiter behandelt.

Die Ergebnisse (Tab. 2) zeigen, daß die Überlebensrate der Kulturen nach Zusetzen von Mannit im Vergleich mit den Kontrollen keinen Unterschied aufwies.

Somit konnte gezeigt werden, daß Mannit, welches aus Gründen der Isotonie dem Actinomycin D beigegeben wurde, keinerlei Einfluß auf das Wachstum der Zellkulturen besitzt.

Tabelle 2: Versuche mit Mannit

Zellein- satz	C_{Mannit}	t	Zahl d.Kolonien pro Flasche	$\bar{X}$	S	Ü.R.
1. 200	0	4	86 106 93	93,7	10,3	46,9
200	20	4	101 92 95 92	93,0	4,2	47,5
2. 200	0	4	65 78 71 52	66,5	11,0	33,3
200	50	4	86 75 118	93,0	22,3	46,5

C_{Mannit} : Konzentration von Mannit in $\mu\text{g/ml}$

t : Einwirkungsdauer von Mannit auf die Kulturen
in Stunden

$\bar{X}$: Mittelwert der Kolonienzahl

S : Standardabweichung

Ü.R. : Überlebensrate der Zellen in %

2.5 Prüfung des Aktivitätsverlustes von Actinomycin D während der Inkubationsdauer

Um sich zu vergewissern, ob die Wirkung von Actinomycin D nach einer Inkubation von mehreren Stunden noch vorhanden war, wurde ein Versuch zur Bestimmung eines eventuellen Aktivitätsverlustes von Actinomycin D durchgeführt.

Zuerst wurde in die Flasche nur Actinomycin D (0,15 µg/ml) plus Medium eingegeben. Dann wurde diese zellfreie Lösung unterschiedlich lang zwischen 0 und 26 Stunden inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden in jede Flasche 500 Zellen eingesät und nun wieder für vier Stunden inkubiert.

Anschließend wurde das Actinomycin D aus den Flaschen entfernt und die Zellen wurden wie bereits vorne erwähnt behandelt.

Wie aus der Tabelle 3 und der graphischen Darstellung (Abb.3) ersichtlich ist, war ein zeitlich abhängiger Aktivitätsverlust von Actinomycin D nicht nachzuweisen. Abgesehen von geringfügigen Schwankungen entsprechen die Ergebnisse weitgehend dem Wert von Actinomycin D ohne vorherige Inkubation.

Tabelle 3: Prüfung des Aktivitätsverlustes
Actinomycin D

PE Kontrolle	C Act D	t	Zahl d. Kolonien pro 100 einge- säter Zellen	Ü.R.
94,5	0,00	-	106 85 98 85	100,0
	0,15	0	9 15 15 16	13,8
	0,15	6	19 11 21 23	18,5
	0,15	7,5	11 20 15 21	16,8
	0,15	9	15 19 13 11	14,5
	0,15	10	13 14 10 10	11,8
	0,15	11,5	26 27 19 20	23,0
	0,15	26	11 6 9 9	8,8

$$PE_{\text{Kontrolle}} = \frac{\text{Zahl der Kolonien ohne Act D Behandlung}}{\text{Zelleinsatz der Kontrollen (200 Zellen)}} \times 100$$

C Act D = Konzentration des Act D in $\mu\text{g/ml}$

t = Inkubationszeit von Actinomycin D vor dem Zelleinsatz in Stunden

Ü.R. = Überlebensrate der behandelten Zellen in %

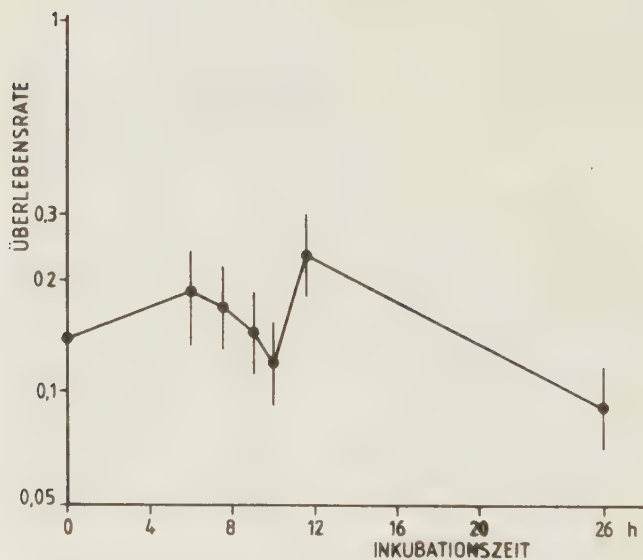


Abb. 3: Prüfung des Aktivitätsverlustes von Act D während der Inkubationsdauer

3. Ergebnisse

In Tabelle 4 werden alle Versuchsergebnisse in ihrer chronologischen Reihenfolge wiedergegeben.

3.1 Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Act D Konzentration

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Überlebensraten Chinesischer Hamsterzellen von der Act D Konzentration wurden drei Versuchsreihen angesetzt, die sich jeweils in der Länge der Expositionszeit unterschieden.

Die Expositionszeiten betrugen 4, 8 bzw. 16 Stunden. Die Zellen wurden in diesen Versuchsreihen steigenden Act D Konzentrationen ausgesetzt. Im Einzelnen betrugen die Dosen 0,01, 0,05, 0,10 und 0,20 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 5). Aus den jeweiligen Überlebensraten dieser Versuche wurden Dosis-Effekt-Kurven in halblogarithmischer Darstellung gezeichnet. Die Mittelwerte der Überlebensraten und die Standardabweichung sind der Abb. 4 zu entnehmen.

Obwohl bei Expositionszeiten von 8 Stunden keine Ergebnisse für Konzentrationen unterhalb 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Act D vorliegen, wird dennoch aus dem Verlauf der Kurve deutlich, daß eine Schulter im Anfangsteil der Kurve vorhanden sein muß.

Insgesamt zeigte sich, daß in allen drei Versuchsreihen die Überlebensrate bei Steigerung der Act D Dosis ab einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ exponentiell abnimmt. Dabei ist die Abnahme der Überlebensrate umso steiler je länger die Expositionszeit ist.

Für Konzentrationen ab 0,05 wurde eine Regressionskurve berechnet, die in Abb. 5 zur Darstellung kommt. Solche Kurven wurden üblicherweise durch die Parameter D_0 und D_q beschrieben (1), wobei D_0 diejenige

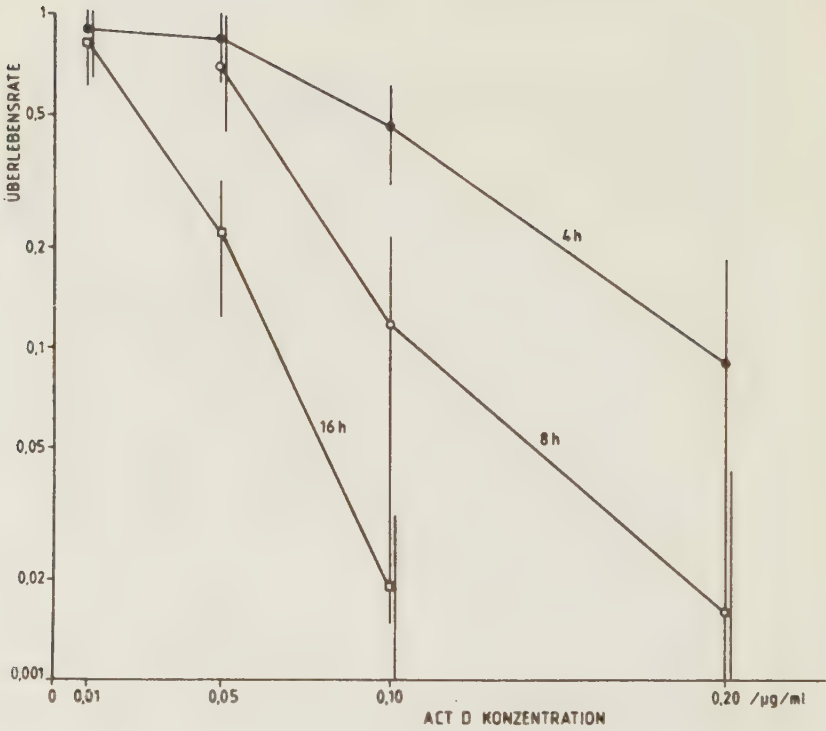


Abb. 4: Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Act D Konzentration bei konstanter Expositionszeit: 4 h, 8 h und 16 h

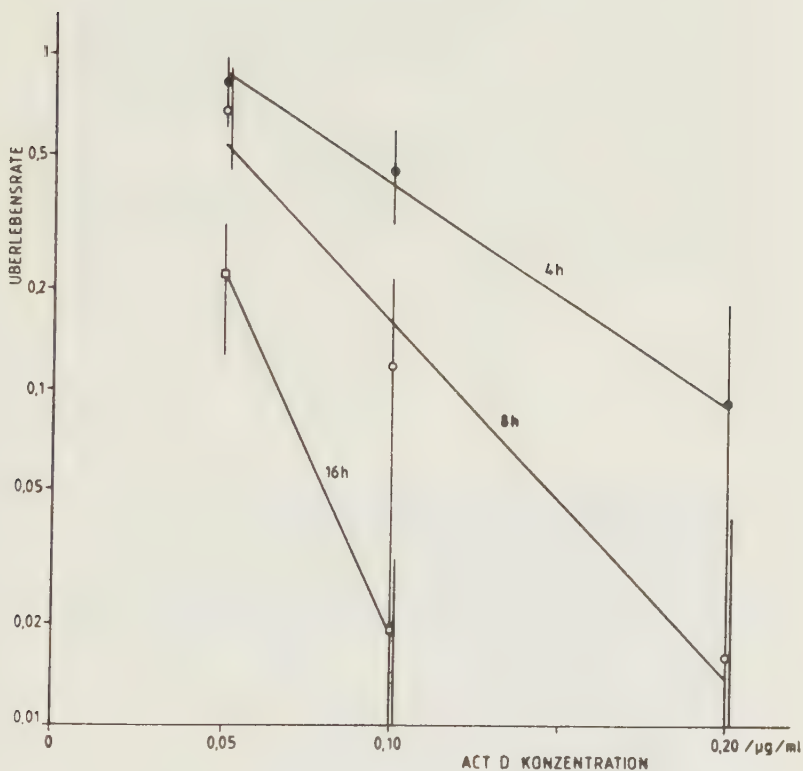


Abb. 5 Regressionskurve: Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Act D Konzentration bei konstanter Expositionsdauer: 4 h, 8 h und 16 h. Die Kurven wurden berechnet für Konzentrationen ab 0,05 $\mu\text{g/ml}$.

Dosis ist, die im gradlinigen, also exponentiellen Teil der Kurve die Zahl der jeweils noch überlebenden Zellen auf $1/e$ (ca 37%) vermindert. Die Schulterweite D_q ergibt sich bei einer halblogarithmischen Darstellung aus dem Schnittpunkt der Verlängerung des exponentiellen Teiles der Kurve mit der Überlebensrate 1 (quasi Schwellendosis).

Die D_o und D_q Werte der oben angeführten Versuche wurden aus Abbildung 4 abgelesen. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

für 4 h	$D_o = 0,107$	, $D_q = 0,042$
für 8 h	$D_o = 0,066$	, $D_q = 0,025$
für 16 h	$D_o = 0,040$	, $D_q = 0,019$

3.2 Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Expositionszeit mit Act D

Untersucht wurde in dieser Testreihe der Einfluß der Expositionsdauer von Act D auf Chinesische Hamsterzellen. Drei Konzentrationen von 0,01, 0,05 und 0,10 $\mu\text{g/ml}$ Act D wurden verwendet. Die Expositionszeiten betrugen 4, 8, 16 bzw. 24 Stunden (Tab. 6). In Abbildung 6 wurde die Zeiteffekt-kurve halblogarithmisch aufgetragen.

Nur eine geringe Wirkung hatte die Expositionszeit auf die Überlebensrate der Zellen bei einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Act D. Selbst bei einer Expositionszeit von 24 Stunden überlebten noch 87,2 % der Zellen. Die höheren Konzentrationen (0,05 und 0,10 $\mu\text{g/ml}$ Act D) ließen die Überlebensrate deutlich absinken. Die Abnahme der Überlebensraten folgt weitgehend einer Exponentialfunktion, wobei der Kurvenverlauf umso steiler ist, je höher die zugesetzte Act D Konzentration ist.

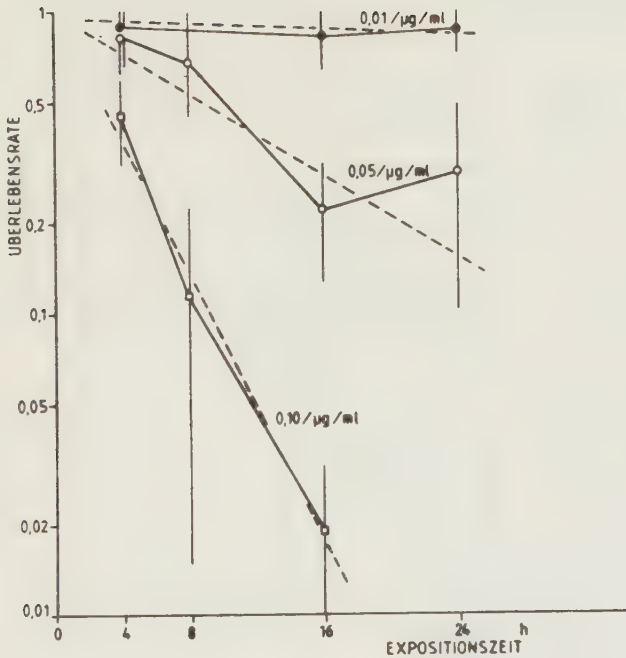


Abb. 6: Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Expositionszeit bei konstanter Konzentration: 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 $\mu\text{g/ml}$ und 0,10 $\mu\text{g/ml}$ mit ihren Regressionskurven (-----).

3.3 Abhängigkeit der Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen von der Fraktionierung der Act D Gabe

Es sollte untersucht werden, ob bei Fraktionierung der Act D Exposition sich die Zellen im zytostatikumfreien Intervall erholen und somit analog zur Fraktionierung ionisierender Strahlen eine Erhöhung der Überlebensrate auftritt.

Zwei Versuche wurden für die Untersuchung der Fraktionierung gemacht. Im ersten Test wurden die Zellen zwei Fraktionen von jeweils 4 Stunden Einwirkdauer ausgesetzt. Das freie Intervall zwischen den Act D Gaben betrug 4 Stunden. Als Konzentrationen wurden 0,10 und 0,20 $\mu\text{g/ml}$ Act D verwendet (Tab. 7).

Im zweiten Versuch betrug die Expositionszeit 2 x 8 Stunden. Dazwischen lag ein Act D-freies Intervall von 16 Stunden. Es wurden Konzentrationen von 0,05 und 0,10 $\mu\text{g/ml}$ Act D benutzt (Tab. 8).

In den Abbildungen 7 und 8 wurden die Ergebnisse aus den vorher beschriebenen nicht fraktionierten Versuchen mit eingezeichnet und dienen als Vergleich. Die Expositionszeiten dieser Tests betrugen bei jeweils gleicher Act D Dosis 1 x 4 h, 1 x 8 h bzw. 1 x 16 h.

Es konnte festgestellt werden, daß keine signifikanten Differenzen in den Überlebensraten der Zellen bestehen, wenn die Act D Expositionszeit durch ein freies Intervall von 4 bzw. 16 Stunden unterbrochen wird oder die Exposition ohne Unterbrechung erfolgt.

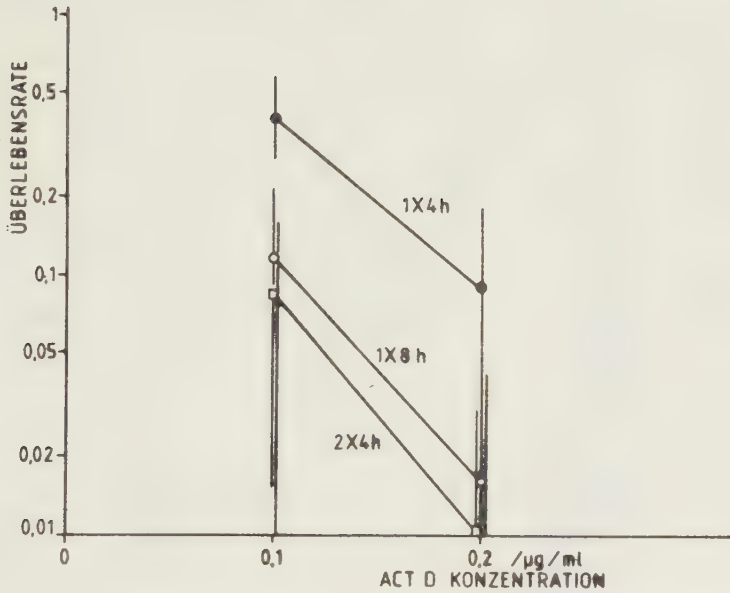


Abb. 7: Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen in Abhängigkeit von fraktionierter Act D Expositionsdauer: 2 x 4 h mit 4 h-freiem Intervall, 1 x 4 h und 1 x 8 h Kurven dienen als Vergleich.

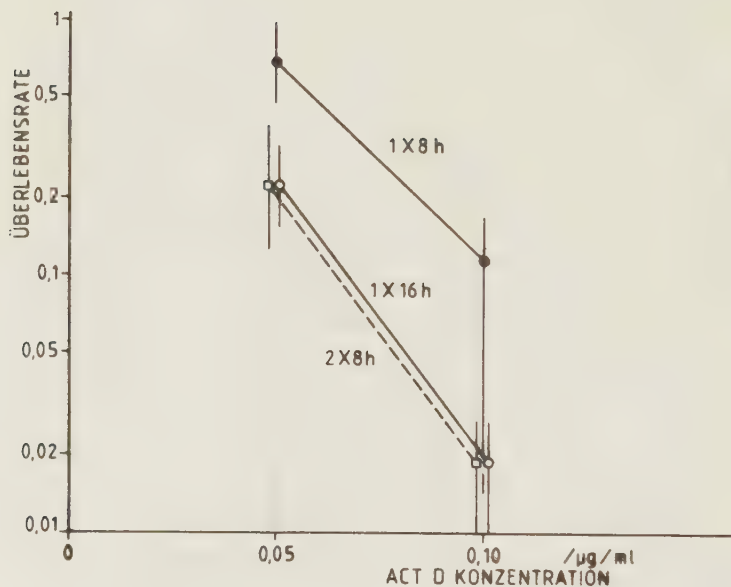


Abb. 8: Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen bei fraktionierter Act D Expositionsdauer von 2 x 8 h mit 16 h-freiem Intervall, 1 x 8 h und 1 x 16 h Kurven dienen als Vergleich.

Tabelle 4: Ergebnisse der durchgeführten Versuche
in chronologischer Reihenfolge

Passage Nr. d. Zelllinie	P.E. ⁽¹⁾ Kontr.	C ⁽²⁾ Act D	t ⁽³⁾	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	Ü.R. ⁽⁴⁾
Hy 83	63,0	0,00	4	69 53 72 59	100,0
		0,01	4	112,7 104,1 107,3 77,1	100,3
		0,05	4	55,9 50,2 66,0	57,4
		0,10	4	36,0 39,4	37,7
		0,01	24	82,5 100,3 84,1 86,7	88,4
Hy 84	72,0	0,00	24	69 60 73 87	100,0
		0,005	24	85,0 86,1 95,8 90,6	90,6
		0,01	24	72,2 77,2 65,0 64,4	69,7
		0,05	24	85,9 11,3 14,9 16,5	13,0
		0,00	8	53 63 60 61	100,0

Passage Nr. d.Zelllinie	P.E.Kontr.	C _{Act D}	t	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	J.R.
		0,05	8	73,6 79,0 81,4 93,9	82,0
		0,10	8	19,2 19,3 17,5 22,5	19,6
Hy 85	91	0,00	16	72,0 97,0 105,0	100,0
		0,01	16	60,0 47,5 67,7 82,0	37,3
		0,05	16	27,5 31,2 27,5	29,0
		0,10	16	1,7 2,9 2,0	2,1
Hy 86	44	0,00	4	45,0 41,0 42,0 48,0	100,0
		0,05	4	104,1 94,6 91,4 103,2	98,3
		0,10	4	43,6 28,2 13,6	28,5
Hy 87	69	0,00	24	69,0 68,0 68,0 72,0	100,0

Passage Nr. d. Zelllinie	P.E.Kontr.	C _{Act D}	t	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	Ü.R.
		0,005	24	95,1 118,0 103,5 107,7	106,1
		0,01	24	101,5 90,4 117,1 101,2	102,3
		0,05	24	19,4 26,1 24,9 28,1	24,6
		0,01	4	78,3 76,1 68,8 69,6	73,2
		0,05	4	80,9 77,4 68,1	75,5
		0,10	4	50,1 45,2 42,0 49,3	46,7
		0,20	4	9,2 20,7 3,0 11,3	11,0
Hy 89	65	0,00	4	64,0 75,0 53,0 66,0	100,0
		0,01	4	100,8 106,2 100,0 65,4	93,1

Passage Nr. d. Zelllinie	P.E. Kontr.	C _{Act D}	t	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	Ü.R.
		0,05	4	89,2 90,5 82,8 105,2	91,9
		0,10	4	66,8 67,1 57,5 49,2	60,2
		0,005	24	111,1 108,6 98,5 107,7	106,5
		0,01	24	85,9 88,3 86,2 90,3	88,2
		0,05	24	33,2 32,0 32,9 29,5	31,9
Hy 90	53	0,00	16	57,0 53,0 57,0 44,0	100,0
		0,01	16	56,6 60,8 82,6 85,3 108,9	80,8
		0,05	16	17,7 23,8 24,2 20,8	21,6
		0,10	16	1,5 2,6 2,5 1,7 1,3	1,9

Passage Nr. d. Zelllinie	P.E.Kontr.	C _{Act D}	t	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	Ü.R.
Hy 91	69,0	0,00	16	67,0	100,0
				60,0	
				76,0	
				75,0	
		0,01	16	108,9	94,1
				97,1	
				87,5	
				82,6	
		0,05	16	26,7	28,7
				26,4	
				29,9	
				31,9	
		0,10	16	2,9	3,3
				3,5	
				3,3	
				3,5	
Hy 97	43,0	0,00	4	45,0	100,0
				40,0	
				40,0	
				47,0	
		0,05	8	32,1	29,8
				27,4	
		0,10	8	3,3	2,9
		0,20	8	0,0	0,0
				0,0	
				0,0	
				0,0	
		0,20	4	0,5	0,9
				0,7	
				0,8	
				0,6	
		0,05	2x8 ⁽⁵⁾	8,8	14,7
				8,1	
				18,1	
				23,7	
		0,10	2x8	0,0	0,2
				0,0	
				0,0	
				0,7	

Passage Nr. d. Zelllinie	P.E.Kontr.	C _{Act D}	t	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	Ü.R.
Hy 97		0,10	2x4 ⁽⁶⁾	1,6	2,6
				2,1	
				1,6	
				4,1	
		0,20	2x4	0,0	0,0
				0,0	
				0,0	
				0,0	
Hy 98	56,0	0,00	4	57,0	100,0
				69,0	
				44,0	
				53,0	
		0,05	8	64,3	77,5
				90,7	
		0,10	8	10,4	10,4
		0,20	8	5,2	1,5
				0,6	
				0,2	
				0,1	
		0,20	4	4,4	7,4
				3,9	
				6,2	
				15,1	
		0,05	2x8	37,5	40,0
				39,5	
				40,0	
				43,0	
		0,10	2x8	3,9	5,5
				5,5	
				5,4	
				7,2	
		0,10	2x4	10,6	10,9
				11,0	
				12,0	
				9,9	
		0,20	2x4	0,1	0,1
				0,0	
				0,1	
				0,1	

Passage Nr. d. Zelllinie	P.E. Kontr.	C _{Act D}	t	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	Ü.R.
Hy 99	59,0	0,00	4	56,0	100,0
				74,0	
		0,20	4	44,0	23,6
				62,0	
		0,05	8	32,5	69,2
				14,7	
		0,10	8	58,0	31,9
				80,3	
		0,20	8	31,9	5,7
				6,2	
		0,10	2x4	6,9	22,1
				4,1	
Hy 102	67,0	0,20	2x4	18,7	4,6
				25,4	
		0,05	2x8	1,8	33,1
				6,3	
		0,10	2x8	5,0	9,0
				4,2	
		0,00	4	33,1	100,0
				9,0	
		0,10	8	67,0	3,1
				86,0	
		0,20	8	62,0	0,1
				53,0	
Hy 102	67,0	0,10	8	4,0	3,1
				2,1	
		0,20	8	4,5	0,1
				1,9	
		0,10	2x4	0,2	2,2
				0,0	
		0,20	2x4	0,0	0,1
				0,0	
		0,10	2x4	0,2	2,2
				3,2	
		0,20	2x4	0,2	0,1
				0,1	
		0,10	2x4	0,03	0,03
				0,03	
		0,20	2x4	0,03	0,03
				0,03	

Passage Nr. d. Zelllinie	P.E. Kontr.	C _{Act D}	t	Zahl d. Kolonien pro 100 eingesäter Zellen	Ü.R.
Hy 102		0,05	2x8	7,6	10,8
				10,3	
				10,5	
				14,6	
		0,10	2x8	0,2	0,1
				0,1	
Hy 102	66,0	0,00	16	0,0	100,0
				0,0	
				0,0	
				0,0	
		0,05	16	77,0	6,6
				59,0	
				73,0	
				57,0	
		0,10	16	4,9	0,1
				9,1	
				5,8	
				0,2	
				0,2	
				0,2	
				0,0	

(1) P.E. Kontr. = s. Seite 15

(2) C_{Act D} = Konzentration von Actinomycin D in $\mu\text{g/ml}$

(3) t = Einwirkungsdauer von Actinomycin D in Stunden

(4) Ü.R. = Überlebensrate der behandelten Zellen in %

(5) 2x8 = Gesamtdauer der Fraktionierung mit einem Act D freien Intervall von 16 Stunden

(6) 2x4 = wie bei (5) mit einem Act D freien Intervall von 8 Stunden

Tab. 5 Zuordnung der Ü.R. bei verschiedenen Konzentrationen von Act D aus den Tab. 4 zu den Zeiten von 4 h, 8 h, 16 h und 24 h. Darstellung der Mittelwerte der Ü.R. $\bar{X}$ und ihrer Standardabweichung S

Ü.R.	bei	0,01	0,05	0,10	0,20	$\mu\text{g/ml}$
4 h		100,3	57,4	37,7	11,0	
		73,2	98,3	28,5	0,9	
		93,1	75,5	46,7	7,4	
		---	91,9	60,2	23,6	
	$\bar{X}$	88,9	82,8	45,2	8,9	
	S	17,7	17,6	14,6	9,3	
8 h			82,0	19,6	1,5	
			29,8	2,9	5,7	
			77,5	10,4	0,1	
			69,2	31,9	---	
			----	3,1	---	
	$\bar{X}$		68,1	11,6	1,6	
	S		22,9	10,1	2,6	
16 h		73,3	28,7	2,1		
		80,8	21,6	1,9		
		94,1	28,7	3,3		
		----	6,6	0,1		
	$\bar{X}$	82,6	22,0	1,9		
	S	18,3	9,2	1,2		
24 h		88,4	12,9			
		69,7	24,6			
		102,3	31,9			
		88,2	----			
	$\bar{X}$	87,2	29,6			
	S	13,9	19,2			

Tab. 6 Zuordnung der Mittelwerte der Ü.R. $\bar{X}$ aus Tab. 5 bei verschiedenen Zeiten zu den konstanten Konzentrationen von 0,01, 0,05 und 0,10 $\mu\text{g/ml}$

$\bar{X}$ der Ü.R.	bei	4 h	8 h	16 h	24 h
0,01		88,9	---	82,6	87,2
0,05		82,8	68,1	22,0	29,6
0,10		45,2	11,6	1,9	---

Tab. 7 Zuordnung der Ü.R. bei Konzentrationen von 0,10 und 0,20 $\mu\text{g/ml}$ Act D zu Fraktionierungszeit von 2 x 4 h

Ü.R.	0,10	0,20	$\mu\text{g/ml}$
bei 2 x 4 h	2,4	0	
	10,9	0,1	
	22,1	4,6	
	<u>2,2</u>	<u>0,1</u>	
$\bar{X}$	8,5	1,0	
S	7,7	2,0	

Tab. 8 Zuordnung der Ü.R. bei Konzentrationen von 0,05 und 0,10 $\mu\text{g/ml}$ Act D zur Fraktionierungszeit von 2 x 8 h

Ü.R.	0,05	0,10
bei 2 x 8 h	14,7	0,2
	40,0	5,5
	33,1	9,0
	<u>10,8</u>	<u>0,1</u>
$\bar{X}$	22,1	1,9
S	14,8	3,1

$\bar{X}$: Mittelwerte der Überlebensrate

S : Standardabweichung

4. Diskussion

4.1 Dosiseffekt:

Die Kurven in Abbildung 4 lassen für niedrige Expositionszeiten eine Schulter erkennen, die im weiteren Verlauf annähernd in einen exponentiellen Teil übergeht. Solche Kurven wurden auch bei Versuchen mit Thio-Tepa, einem alkylierenden Zytostatikum an Chinesischen Hamsterzellen und HeLa-Zellen gefunden (27, 33). Diese Schulterkurven entsprechen weitgehend denen nach Bestrahlung (32). Gewöhnlich wurden sie mit dem Erholungsphänomen von subletalen Schäden bei Bestrahlung in Zusammenhang gebracht (16). Hier in diesem Versuch konnte die Schulter jedoch nicht, wie die Fraktionierungsversuche zeigen, mit einer Erholung erklärt werden. Die Ausbildung der Schulter muß daher auf anderen Mechanismen beruhen. Einen anderen Kurvenverlauf als den hier in dieser Arbeit erhaltenen, fanden Bacchetti et al (2) in ihrem Versuch mit Act D an Mouse L-Zellen sowie Elkind und Kano (12) an Chinesischen Hamsterzellen. Es ergab sich bei ihnen eine biphasische Überlebenskurve, die im ersten Teil steiler und im zweiten Teil nach einem Knick flacher abfiel (Hockeystick). Dieser biphasische Verlauf wurde dadurch erklärt, daß sich die Zellpopulation in einer sensitiven und einer resistenten Phase befand.

Die Wirkung von Act D hängt sowohl von der Konzentration als auch von der Länge der Expositionszeit ab. In ihrer umfassenden Arbeit über Pharmakologische Dosis-Effekt Beziehungen postulierten Druckrey und Küpfmüller (10) für alle zytotoxisch wirkenden Pharmaka folgende Gleichung:

$$(C - C_s)^n \cdot (t - t_s) = \text{konstant}$$

Dabei ist C die wirksame intrazelluläre Konzentration, C_s die angenommene Konzentration für unendlich lange Expositionszeit, t die tatsächliche Expositionszeit und t_s die angenommene minimale Expositionszeit für eine unendlich hohe Zytostatikakonzentration. Der Exponent n kann größer oder kleiner als 1 sein. Mellet (24) hat die vereinfachte Gleichung $C \times t = \text{konstant}$ übernommen und hat diese generell für Zytostatika vorgeschlagen.

Für die vorliegende Arbeit wurde folgende Gleichung ermittelt:

$$C^{1,4} \cdot t = \text{konstant}$$

wobei der Exponent $n=1,4$ wie folgt errechnet wurde:

Die Überlebensrate Chinesischer Hamsterzellen nach Act D Behandlung kann mit der Exponentialfunktion

$$SF = e^{-k C^n t}$$

beschrieben werden.

Dabei ist

SF	= Überlebensrate
e	= Basis des natürlichen Logarithmus
k	= Konstante, die die Sensitivität von Zellen anzeigt
C	= Konzentration von Act D im Medium ($\mu\text{g/ml}$)
t	= Expositionsdauer in Minuten

Bei gleicher Überlebensrate wurden nun die entsprechenden Act D Konzentrationen für verschiedene Expositionszeiten aus Abb. 5 entnommen und in die obige Gleichung eingesetzt. Dadurch ließen sich n und k errechnen. Für n ergab sich der Wert 1,4 für k 5,3.

In seiner Arbeit über die Wirkung von 5 Flour-Uracil auf Chinesische Hamsterzellen fand Mayerhofer (23) die Gleichung:

$$C^{1,65} \cdot t = \text{konstant}$$

Die relative Bedeutung der Konzentration von Act D gegenüber der Expositionszeit wird an Hand von folgendem Beispiel demonstriert:

Für eine Inaktivierung von 80% der Zellen bei 4 Stunden braucht man eine Konzentration von 0,15 $\mu\text{g/ml}$ Act D. Wenn man um die gleiche Wirkung zu erzielen die Expositionszeit auf 8 Stunden verdoppelt, verringert sich die Konzentration um das 1,6-fache (von 0,15 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,09 $\mu\text{g/ml}$). Umgekehrt, wenn man die Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,10 $\mu\text{g/ml}$ Act D verdoppelt, um in beiden Fällen eine Überlebensrate von 20% der Zellen zu erzielen, verringert sich die Expositionszeit von 20,8 h auf 6,4 h. Das ergibt einen Faktor von 3,25. Dieses Beispiel veranschaulicht, daß die Konzentration bei Act D eine größere Rolle spielt als die Expositionsdauer.

Im Gegensatz zu Act D spielt bei Behandlung mit Methotrexat - wie Eichholtz und Trott (11) nachwiesen - die Zeitkomponente eine wesentlich größere Rolle. In ihrem Versuch mit Methotrexat an Chinesischen Hamsterzellen ermittelten sie, daß die Konzentration von Methotrexat um das 8-fache verringert werden konnte, um eine Überlebensrate von 10% zu erhalten, wenn sich die Expositionszeit von 24 h auf 48 h verdoppelt. Dagegen konnte, wenn man die Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ auf 1,0 $\mu\text{g/ml}$ verdoppelte, die Expositionszeit nur um 10% verringert werden, um die gleiche Überlebensrate zu erhalten.

4.2 Zeiteffekt:

Die Ergebnisse der Untersuchung über den Einfluß des Zeiteffektes von Act D auf die Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen waren durch rein exponentielle Kurven befriedigend beschrieben (Abb. 6). Für die Konzentration von $0,01 \mu\text{g/ml}$ Act D blieben die Überlebensraten für die Einwirkdauer zwischen 4 h bis 24 h fast unverändert und lagen bei ca. 90%. Es scheint, als ob diese Konzentration ($0,01 \mu\text{g/ml}$) für die untersuchte Zeitspanne eine Schwellendosis wäre. Für höhere Dosen fielen die Überlebensraten, in Abhängigkeit von der Konzentration, steil ab. Bei $0,10 \mu\text{g/ml}$ Act D überlebten während einer Einwirkdauer von 10 h bereits nur noch etwa 2% der Zellen.

Ähnliche Versuche über den Zeiteffekt wurden von Valeriote et al. (34) durchgeführt. Mittels des Milzkolonietests untersuchten sie an AKR Mäusen den zytoziden Effekt von Act D auf Leukämiezellen (LCFU) und normale hämatopoetische Knochenmarkzellen (NCFU). Dabei fanden sie, daß bei einer niedrigen Dosis von Act D ($2,5 \mu\text{g/Maus}$ bis zu $10 \mu\text{g/Maus}$) die Überlebenskurve für LCFU am Anfang ein Plateau aufwies. Das Plateau blieb für die Kurve von $2,5 \mu\text{g/Maus}$ für mehr als 10 h erhalten. Für höhere Dosen als $10 \mu\text{g/Maus}$ verliefen die Kurven steil nach unten, ohne vorher ein Plateau gebildet zu haben. Dieser steile Abfall der Kurve wurde von manchen Untersuchern auf eine selektive Toxizität von Act D in der frühen S Phase des Zellzyklus zurückgeführt (2, 7, 9, 14). Darüber hinaus ist in einigen Untersuchungen gezeigt worden, daß eine niedrige Act D Dosis den Eintritt von Zellen in die S Phase verhinderte (2, 3, 26, 28). Demnach stellte das Plateau eine

Blockierung der Zellen in der G_1 Phase dar. Die Dauer der Hemmung der Zellprogression hängt dabei von der Höhe der Dosis ab. Dagegen wirkt Act D bei höherer Dosierung in allen Zellphasen tödlich (2).

Auf Grund der unterschiedlichen Wirkung von Act D in verschiedenen Dosierungen wurde dieses Zytostatikum von Bruce et al. (6) in die Gruppe der phasenspezifischen Zytostatika eingeordnet. Skipper et al. (30) reihten dagegen Act D in die nicht phasenspezifische Kategorie ein. Die phasenspezifische Wirkung hätte natürlich eine wesentliche Bedeutung in der chemotherapeutischen Behandlung mit Act D, da die Tötung von Zellen durch niedrige Dosen allein auf diejenigen Zellen beschränkt bliebe, die sich gerade in der DNA Synthese-Phase befinden.

Andererseits wäre Act D ineffektiv für nicht proliferierende Zellen. Eine geringe Act D Dosis würde also genügen, um rasch proliferierende maligne Zellen während der DNA Synthese zu töten, wogegen normale Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, überleben könnten.

Die Überlegungen wurden aber durch die eigenen Versuchsergebnisse nicht gestützt, denn es fand sich weder bei der Konzentrationsabhängigkeit noch bei der Zeitabhängigkeit der Knick in der Dosiswirkungskurve, der bei einer ausgeprägten Phasenspezifität nachzuweisen sein müsste. Auch die Zeitabhängigkeit gab keinen Hinweis auf den postulierten G_1 - Block.

4.3 Fraktionierung:

Säugerzellen zeigen meist nach Behandlung mit Röntgenstrahlen, anderer locker ionisierender Strahlen oder mit manchen alkylierenden Zytostatika eine Schulterkurve. Diese Schulter wird durch die Kumulation subletaler Schäden bewirkt, die für sich allein nicht zur Zellinaktivierung führen, aber die Zelle gegenüber der zytotoxischen Wirkung einer weiteren Bestrahlung sensibilisieren. Andererseits können sich die Zellen schnell von ihren subletalen Schäden erholen, wie dies von Elkind und Sutton (16) im Fraktionierungsversuch bei Chinesischen Hamsterzellen nachgewiesen wurde. Sie fanden, daß sich die Wirkungen von zwei Röntgendosen, die durch ein freies Intervall getrennt wurden, nicht einfach zu der üblichen exponentiellen Form addierten, sondern eine zweite Schulter bildeten, wodurch sich die Wirkung der Gesamtdosis herabsetzte. Das heißt, daß die Überlebensrate somit höher liegt, als wenn man die Zellen mit der gleichen Gesamtdosis aber ohne Unterbrechung behandelt. Sie interpretierten dieses Ergebnis als eine Erholung von dem durch die erste Dosis verursachten subletalen Schäden.

Korrespondierend zu Fraktionierungsversuchen mit Röntgenstrahlen, von denen das Erholungsphänomen von subletalen Schäden bekannt ist, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Fraktionierungsversuche mit Act D durchgeführt. Die Ergebnisse weichen deutlich von denen bei Röntgenbestrahlung ab, da ein Fraktionierungseffekt in diesen Versuchen nicht erzielt werden konnte.

Wie man aus der Abb. 8 entnehmen kann, überlagert sich die Überlebenskurve der Fraktionierung von 2×8 h (dazwischen ein 16 h-freies Intervall) mit der Überlebenskurve vom vorangehenden Dosiseffektversuch, der eine Expositionszeit von durchgehend 16 h hatte (siehe auch Abb. 4 und 5). Daraus kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß Act D für die hier untersuchte Zeitspanne auf Chinesische Hamsterzellen keinerlei Fraktionierungseffekt besitzt. Auch für den zweiten Fraktionierungsversuch von 2×4 h, der von einem 4-stündigen Ruhe-Intervall unterbrochen wurde (Abb. 7), kann der gleiche Schluß wie oben gezogen werden. Zwar überlagert sich die Überlebenskurve nicht mit der Dosiseffektkurve von 1×8 h, sondern liegt geringfügig unterhalb; die Abweichung der beiden Kurven voneinander ist aber nicht signifikant. Somit können die Ergebnisse von der Untersuchung von Elkind und Kano (1970), die in ihrem Versuch mit fraktionierter Gabe von Act D an Chinesischen Hamsterzellen eine erhöhte Überlebensrate beobachtet hatten, nicht bestätigt werden. Sie haben diesen Effekt auf eine Kumulation und Progression der Zellen in einer wenig empfindlichen Zellphase zurückgeführt.

Eine Fraktionierungswirkung war auch bei fraktionierter Gabe von Schwefellost an Chinesischen Hamsterzellen gefunden worden. Die Schulter wurde wieder vollständig hergestellt und hat dadurch zu einer Erhöhung der Überlebensrate der Zellen geführt (22). Kein Fraktionierungseffekt konnte dagegen bei den meisten alkylierenden Zytostatika z.B. Stickstofflost festgestellt werden, obwohl deren Dosiswirkungskurven ausgeprägte Schultern wie bei der Röntgenbestrahlung aufwiesen (29, 35). Eine dritte Variation von Ergebnissen

der Fraktionierung haben Versuche mit Thio-Tepa an HeLa- und Chinesischen Hamsterzellen demonstriert (27, 33). Dort verstärkt die Fraktionierung den Zytostatischen Effekt von Thio-Tepa, so daß die Überlebensraten der Zellen erniedrigt wurden.

5. Zusammenfassung

Chinesische Hamsterzellen wurden mit dem Zytostatikum Actinomycin D behandelt, um ihre Überlebensrate in Abhängigkeit von der Konzentrationsgröße, Expositionszeit und Fraktionierung zu studieren.

In einer Anzahl von Versuchsreihen wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

Bei einer konstant gehaltenen Expositionszeit nahm die Überlebensrate mit zunehmender Konzentration in Form einer Schulterkurve ab. Die Überlebensrate nahm mit zunehmender Expositionszeit exponentiell bei gegebener Konzentration ab.

Die Abhängigkeit der Überlebensrate von beiden Größen d.h. von der Konzentration und der Expositionsdauer konnte durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$SF = e^{-5,3 C^{1,4} t}$$

In den Fraktionierungsversuchen, in denen die Gesamt-expositionszeit durch ein zytostatikumfreies Intervall unterbrochen wurde, konnte kein Fraktionierungseffekt im Sinne einer Erholung von subletalem Schaden erzielt werden. Die Wirkung des Zytostatikums wurde auch nicht durch die Fraktionierung verstärkt.

Literaturverzeichnis

1. Alper, T., Fowler, J.F., Morgan, R.L., Vornberg, D.D., Ellis, F., Oliver, R. : The characterization of the "type C" survival curve. Br. J. Radiol., 35, 722, 1962
2. Bacchetti, S., Whitmore, G.F. : Actinomycin D: Effects on Mouse L-Cells. Biophysical J., Vol. 9, 1427-1445, 1969
3. Baserga, R., Estensen, R.D., Petersen, R.O. : Inhibition of DNA synthesis in Ehrlich ascites cells by Act D. II. The Presynthetic block in the cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 1141-1148, 1965
4. Bases, R.E.: Modification of the radiation response determined by single cell technics: Actinomycin D. Cancer Res., 19, 1223-1229, 1959
5. Born, R.: Zellkinetische Untersuchungen an chronisch hypoxischen Fibroblasten des Chinesischen Hamsters. Dissertation, Biologische Fakultät der Uni. München, 1974
6. Bruce, W.R., Meeker, B.E., Valeriote, F.A.: A comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. J. Natl. Cancer Inst., 37, 233-245, 1966
7. Buhyan, B.K., Scheidt, L.G., Fraser, T.J.: Cell cycle phase specificity of antitumor agents. Cancer Res., 32, 398-407, 1972
8. D'Angio, G.J., Farber, S., Maddock, C.L.: Potentiation of X-ray effects by Actinomycin D. Radiobiology 73, 175-177, 1959

9. Djordjevic, B., Kim, J.H.: Different lethal effects of Mitomycin C and Actinomycin D during the division cycle of HeLa cells. *J. cell Biol.*, 38, 477-482, 1968
10. Druckrey, H., Küpfmüller, K.: Dosis und Wirkung in: *Die Pharmazie*, 8. Beiheft, *Ergänzungsband*, 515-645, Berlin: W. Saenger 1949
11. Eichholtz, H., Trott, K.R.: Effect of Methotrexate concentration and exposure time on mammalian cell survival in vitro. *Br.J. Cancer*, 41, 277-284, 1980
12. Elkind, M.M., Kano, E., Sutton-Gilbert, H.: Cell killing by Actinomycin D in relation to the growth cycle of Chinese hamster cells. *J. of Cell Biol.* 42, 366-377, 1969
13. Elkind, M.M. Kano, E.: Actinomycin D and radiation fractionation studies in asynchronous and synchronized Chinese hamster cells. *Radiation Res.*, 44, 484-497, 1970
14. Elkind, M.M., Sakamoto, K., Kamper, C.: Age-dependent toxic properties of Aot D and X-rays in cultured Chinese hamster cells. *Cell Tissue Kinet.* 1, 209-224, 1968
15. Elind, M.M., Sakamoto, K.: Combined effects of X-irradiation and chemotherapeutic drugs (Nitrogen mustard and Actinomycin D). *Front, Radiation Ther. Onc.* 4, 53-75, Karger, Basel/New York 1969
16. Elkind, M.M., Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat. Res* 13, 556-593, 1960
17. Farber, S.: Carcynolytic action of antibiotics: Puromycin and actinomycin D. *Am. J. Path* 31. 582, 1955

18. Faber, S., Maddock, C., and Swaffield, M.:
Studies on the carcinolytic and other biological activity of actinomycin D. (Abstract.)
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2, 104, 1956
19. Herstellerangabe: Lyovac-Cosmegan (Actinomycin D) MSD Sharp & Dohme GmbH, München, 1976
20. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Thieme Verlag Stuttgart, s. 122, 1974
21. Manaker, R.A., Gregory, I.J., Vinning, L.C.,
and Waksman, S.A., Actinomycin III: The production and properties of a new actinomycin.
Antibiotics Ann. 2 853-857, 1954-1955
22. Mauro, F., Elkind, M.M., Sakamoto, K.:
Differences in survival variation during the growth cycle of cultured Chinese hamster cells treated with x-rays and sulfur mustard. Cancer Res. 28 1150-1156, 1968a
23. Mayerhofer, J.M.: Die Wirkung von FU auf Chinesische Hamsterzellen. Dissertation, Medizinische Fakultät Univ. München 1978
24. Mellet, L.B.: The constancy of the product of concentration and time. In: Antineoplastic and immunosuppressive agents, Handb. Exp. Pharm. Ed. Sartorelli and Johns. vol. 38, Berlin Springer Verlag, 203, 1974
25. Metzler, D.E.: Actinomycin D, A toxic antibiotic. Biochemistry, Acad. Press, N.Y., 916-917, 1977
26. Pery, R.P.: Selective Effects of Act D on the intracellular distribution of RNA synthesis in tissue culture cells. Exptl. Cell Res., 29, 400-409, 1963

27. Phillip, R.: Die Wirkung von Thio-TEPA auf HeLa-Zellen. Dissertation, Medizinische Fakultät Univ. München, 1975
28. Rickinson, A.B.: The effects of low concentrations of Act D on the progress of cells through the cell cycle. *Cell Tissue Kinetics* 3, 335-347, 1970
29. Sakamoto, K., Elkind, M.M.: X rays and nitrogen mustard: Independent action in Chinese hamster cells. *Biophys. J.* 9, 1115-1130, 1969
30. Skipper, H.E. Schabel, F.M., Mellet, L.B., Montgomery, J.A., Wilkof, L.J., Lloyd, H.H., Brockman, R.W.: Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules, *Cancer Chemoth. Rep.*, 54, 431, 1970
31. Sobell, H.M.: The stereochemistry of Actinomycin binding to DNA. *Cancer Chemoth. Rep.* 58, 101-116, 1974
32. Trott, K.R.: Strahlenwirkung auf die Vermehrung von Säugetierzellen. In: *Handbuch der medizinischen Radiologie*, II/3, Hrsg. O. Hug und A. Zuppinger Springer-Verlag 1972
33. Trott, K.R., Bölükbası, E.: The effect or fractionated exposure to Thio-TEPA upon Chinese hamster cells in vitro. *Zeitschrift für Krebsforsch.* 87, 301-309, 1976
34. Valeriote, F., Vietti, T., Tolen, S.: Kinetics of the lethal effect of Act D on normal and leukemic cells. *Cancer Res.* 33, 2658-2661, 1973
35. Walker, I.G., Thatcher, C.J.: Studies on the lethal effects on sulfur mustard on dividing mammalian cells. *Radiat. Re.* 34, 110-127, 1968

Lebenslauf

Am 22.12.1952 wurde ich Sok Hia Lie - Ruf als Tochter des Kaufmanns Eng Seng Lie und seiner Ehefrau Hoei Tjin Kwee in Jakarta geboren. Ab 1958 ging ich in Jakarta zur Schule. Nach zwölfjähriger Schulzeit, in der ich Volksschule, Mittelschule und Oberschule besuchte, legte ich meine Reifeprüfung im November 1970 in Jakarta mit Erfolg ab. Vom Januar 1971 bis August 1972 studierte ich an der Technischen Universität Trisakti in Jakarta Elektrotechnik. Ende September 1972 kam ich nach Deutschland, wo ich zunächst an der Universität München die deutsche Sprache erlernte. Anschließend besuchte ich für ein Jahr das Studienkolleg der Universität München und legte dort im Februar 1974 die Abschlußprüfung ab. Im Sommer 1974 begann ich dann das Studium der Humanmedizin an der Universität München, das ich im April 1980 mit der dritten ärztlichen Prüfung erfolgreich beendete. Im August 1980 heiratete ich den Arzt Josef Ruf. Vom August 1981 bis Dezember 1982 war ich als Assistenzärztin in chirurgischer Abteilung des Krankenhauses Lauingen tätig. Im Januar 1983 wechselte ich in die innere Abteilung des selben Hauses über.

